

Stökkbreytingar í hvarfstöð alkalísks fosfatasa úr *Vibrio* sp.

Katrín Guðjónsdóttir¹⁾, Ólafur S. Andrésson²⁾ og Bjarni Ásgeirsson¹⁾.

¹⁾ Raunvísindastofnun Háskóla Íslands, Dunhaga 3, 107 Reykjavík.

²⁾ Líffræðistofnun Háskóla Íslands, Sturlugötu 7, 101 Reykjavík.

Kuldavirk ensím hafa þróast til að geta haldið kvikum hreyfingum sínum (e. dynamic movements) gangandi við hitastig þar sem ensím úr ylkærum og hitakærum tegundum geta ekki tryggt nægjanlegan hvarfahraða í grundvallarefnaskiptum lífs. Aukin hvötunarvirkni við lág hitastig og hitanæmni eru einkenni kuldavirkra ensíma og eru talin afleiðing af auknum sveigjanleika í byggingu þeirra. Nákvæmlega hvernig slíkur sveigjanleiki næst er ekki vel skilið og er líklega misjafnt eftir ensímjölskyldum. Kuldavirkur alkalískur fosfatasi (AP) úr íslenskri *Vibrio* sjávarörveru er mjög hitaóstöðugt ensím. Enn er ekki vitað hvort sá eiginleiki er staðbundinn við hvarfstöðina eða eigi sér rætur í heildarpróteinbyggingunni. Í hvarfstöð alkalískra fosfatasa eru þrjár málmjónir (oftast Zn, Zn, Mg) sem taka þátt í hvötun. Mg jónin hefur auk þess áhrif á stöðugleika. Samanburður á öllum raðgreindum AP hefur sýnt að þær amínósýrur sem tengjast Zn málmunum eru vel varðveittar. Tvær amínósýrur sem tengjast Mg jóninni eru hinsvegar breytilegar í ólíkum AP. Asp153/Lys328 í *E. coli* AP eru His116/Trp274 í *Vibrio* AP og His/His í AP úr spendýraensímum. Þetta gæti skýrt mismunandi hvötunarhæfin þessarra ensíma. Við höfum stökkbreytt Trp274 í *Vibrio* AP í Lys, His eða Ala. Öll þessi stökkbrigði reynust hafa aukinn hitastigsstöðugleika virkrar byggingar auk minni hvarfefnissækni (K_m) og lægri hvötunarhraða (k_{cat}). Lys274 og His274 stökkbrigðin höfðu einnig aukinn hitastigsstöðugleika heildarpróteinbyggingar. Þessar niðurstöður samræmast kenningunni um að hvötunarhraði og hvarfefnisbinding séu nátengd sveigjanleika ensímbyggingar. Ala274 og His274 afbrigðin höfðu einnig aukinn stöðugleika við lág sýrustig.

Niðurstöður verkefnisins sýna að stök amínósýrubreyting í hvarfstöð *Vibrio* AP dugir til að breyta byggingarstöðugleika og hvötunareiginleikum ensímsins í átt að einkennum hitaþolnari afbrigða.